

2 J PN=JP 2083336

S1

2 AN,PN=JP 2083336

?t s1/9/all

1/9/1 (Item 1 from file: 351)

DIALOG(R) File 351:DERWENT WPI

(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008059284

WPI Acc No: 89-324396/198944

XRAM Acc No: C89-143659

**Compsn. for preventing staphylococcal infections - contains lysostaphin,
surfactant and penicillin for synergistic effect**

Patent Assignee: APPLIED MICROBIOLOGY INC (MICR-N); PUBLIC HEALTH RES
(PUBL-N)

Inventor: BLACKBURN P; POLLAK J; POLLACK J

Number of Countries: 022 Number of Patents: 013

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
ZA 8806446	A	19890830	ZA 886446	A	19880830		198944 B
EP 359873	A	19900328	EP 88308667	A	19880919		199013 N
PT 88472	A	19900330					199017 N
JP 2083336	A	19900323	JP 88234685	A	19880919		199018 N
AU 8821793	A	19900308					199019 N
DK 8804846	A	19900301					199019 N
HU 55229	T	19910528					199127 N
EP 359873	B1	19930915	EP 88308667	A	19880919	A61K-037/54	199337 N
DE 3884200	G	19931021	DE 3884200	A	19880919	A61K-037/54	199343 N
			EP 88308667	A	19880919		
JP 94045553	B2	19940615	JP 88234685	A	19880919	A61K-037/54	199422 N
CA 1330758	C	19940719	CA 575957	A	19880829	A61K-037/54	199434 N
IE 63009	B	19950322	IE 882675	A	19880905	A61K-031/43	199521 N
IL 87686	A	19951231	IL 87686	A	19880906	A61K-038/48	199614 N

Priority Applications (No Type Date): ZA 886446 A 19880830; EP 88308667 A
19880919; JP 88234685 A 19880919; DE 3884200 A 19880919; CA 575957 A
19880829; IE 882675 A 19880905; IL 87686 A 19880906

Cited Patents: 8.Jnl.Ref

Patent Details:

Patent Kind Lan Pg Filing Notes ~ Application Patent

ZA 8806446 A 38

EP 359873 A E

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

EP 359873 B1 E 15

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

DE 3884200 G Based on

EP 359873

JP 94045553 B2 13 Based on

JP 2083336

Abstract (Basic): ZA 8806446 A

Compsn. (A) for killing staphylococci comprises lysostaphin (I) and synergist(s) from penicillin, synthetic penicillins, other antibiotics, chelating agents, mild surfactants and other membrane active agents, in amts. effective to kill staphylococci.

Preventing bovine mastitis comprises dipping teats in a soln. (B) of 0.01-10.0 mcg/ml of (I) in a suitable carrier, before and after each milking. The compsn. (A) and teat dip soln. (B) may also comprise lysozyme and mutanolysin.

USE/ADVANTAGE - Used for treatment and prevention of staphylococcal infections esp. bovine mastitis. (I) is effective even against chronic mastitis without adverse immunogenic effects. The compsn. is highly

, synergistic, with potentiation of (I) by e.g. 1000 times or more when surfactants are added. The compsn. may also be infused into the infected udder, and is also useful in wound dressings and medications, disinfectant scrubs, wipes or lotions, and in surgical implants. Compsns. may also be used for cleaning medical instruments, surfaces, bedding, etc., for food related uses (treatment of meat, eggs, cheese and fish or food packaging and handling appts.), and for nasal infusion to reduce intranasal carriage of Staphylococci. (Provisional Basic previously advised in week 8939)

0/1

Abstract (Equivalent): EP 359873 B

A lysostaphin-containing composition for killing staphylococci (and which therefore does not itself contain staphylococci), characterised in that it also comprises at least one cell wall-active antibiotic in an amount effective synergistically to enhance the bactericidal effect of lysostaphin against staphylococcal mastitis.

Dwg.0/1

Title Terms: COMPOSITION; PREVENT; STAPHYLOCOCCUS; INFECT; CONTAIN;
LYSOSTAPHIN; SURFACTANT; PENICILLIN; SYNERGISTIC; EFFECT

Derwent Class: B05; C03; D16

International Patent Class (Main): A61K-031/43; A61K-037/54; A61K-038/48

International Patent Class (Additional): A61K-031/545; A61K-035/70;

A61K-035/74; A61K-037/02; A61K-045/06; C07D-499/00; C12N-009/48;

C12P-021/02; C12R-001/07; A61K-031-43; A61K-037/54

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B02-P03; B04-B04A5; B04-C03C; B10-B01B; B12-A07;

B12-C09; B12-D07; B12-L09; C02-P03; C04-B04A5; C04-C03C; C10-B01B;

C12-A07; C12-C09; C12-D07; C12-L09; D03-A; D03-H02E; D09-A01C; D09-C01;

D09-C04B

Chemical Fragment Codes (M1):

03 F012 F013 F014 F113 H4 H403 H483 H5 H522 H589 H8 J0 J011 J2 J271 K0
L8 L814 L821 L833 M225 M231 M262 M281 M312 M323 M332 M342 M343 M373
M383 M391 M393 M423 M431 M510 M521 M530 M540 M782 M903 M904 M910
P220 P861 Q233 Q616 V0 V743 R01869-M

04 F012 F013 F014 F113 H4 H403 H483 H5 H522 H589 H8 J0 J011 J2 J271 K0
L8 L814 L821 L833 M225 M231 M262 M281 M312 M323 M332 M342 M343 M373
M383 M391 M393 M423 M431 M510 M521 M530 M540 M782 M903 M904 M910
P220 P861 Q233 Q616 V0 V743 R01871-M

05 F012 F013 F014 F113 H4 H403 H483 H5 H522 H589 H7 H721 H8 J0 J011 J2
J271 K0 L8 L814 L821 L833 M225 M231 M262 M281 M312 M323 M332 M342
M343 M373 M383 M391 M393 M423 M431 M510 M521 M530 M540 M782 M903
M904 M910 P220 P861 Q233 Q616 V0 V743 R01870-M

06 G013 G100 H4 H401 H481 H5 H541 H589 H8 M220 M222 M231 M240 M281 M312
M323 M332 M342 M383 M393 M423 M431 M510 M520 M531 M540 M782 M903
P220 P861 Q233 Q616 V743 R12730-M

08 M423 M431 M782 M903 P220 P861 Q233 V500 V540

Chemical Fragment Codes (M2):

01 D013 D016 D019 E670 G010 G100 J0 J012 J1 J111 J3 J321 J5 J521 L9
L941 M210 M211 M240 M282 M311 M321 M342 M372 M391 M412 M431 M511
M520 M531 M540 M782 M903 M904 M910 P220 P861 Q233 V0 V161 R00222-M

02 H1 H103 H182 J0 J014 J1 J173 M280 M311 M312 M321 M323 M332 M342 M349
M381 M383 M391 M393 M416 M431 M620 M782 M903 M904 M910 P220 P861
Q233 Q504 R00195-M

09 F012 F013 F014 F015 F016 F123 H4 H404 H423 H481 H5 H521 H592 H8 K0
L8 L814 L821 L831 M220 M222 M224 M225 M231 M271 M272 M281 M311 M321
M342 M373 M391 M413 M431 M510 M521 M530 M540 M782 M903 M904 P220
P861 Q233 Q616 8944-40401-M

10 H401 H402 H481 H482 H721 H722 H723 J0 J011 J012 J013 J171 J271 J272
J273 M220 M221 M222 M223 M224 M225 M231 M262 M281 M282 M283 M313
M320 M321 M332 M343 M383 M391 M416 M431 M620 M782 M903 M904 P220

P861 Q233 Q616 8944-40402-M

Chemical Fragment Codes (M5):

07 M431 M782 M903 M904 P220 P861 Q233 S131 S132 S133 S134 S142 S203
S212 S317 S503 S512 U323 U330 U332 U550 U570 8944-40403-M

Derwent Registry Numbers: 0195-U; 0222-U; 0497-U; 1869-U; 1870-U; 1871-U

Specific Compound Numbers: R01869-M; R01871-M; R01870-M; R12730-M; R00222-M
; R00195-M

Generic Compound Numbers: 8944-40401-M; 8944-40402-M; 8944-40403-M

1/9/2 (Item 1 from file: 347)

DIALOG(R)File 347:JAPIO

(c) 2000 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

03107836

TREATMENT OF MASTITIS AND OTHER STAPHYLOCOCCUS INFECTED DISEASES

PUB. NO.: 02-083336 [*JP 2083336* A]

PUBLISHED: March 23, 1990 (19900323)

INVENTOR(s): PIITAA BURATSUKUBAAN
JIYUN PORATSUKU

APPLICANT(s): PUB HERUSU RES INST OBU THE SHITEI OBU NEW YORK THE [000000]
(A Non-Japanese Company or Corporation), US (United States of
America)

APPL. NO.: 63-234685 [JP 88234685]

FILED: September 19, 1988 (19880919)

INTL CLASS: [5] A61K-037/54; A61K-037/54; A61K-031/43

JAPIO CLASS: 14.4 (ORGANIC CHEMISTRY -- Medicine); 11.3 (AGRICULTURE --
Livestock)

?

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-83336

⑪ Int. Cl.⁵
A 61 K 37/54
// (A 61 K 37/54
31:43)

識別記号
ADZ

庁内整理番号
8615-4C
7475-4C

⑬ 公開 平成2年(1990)3月23日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全14頁)

⑭ 発明の名称 乳母炎およびその他のブドウ球菌感染症の治療法

⑮ 特 願 昭63-234685

⑯ 出 願 昭63(1988)9月19日

⑰ 発 明 者 ビーター ブラックバ
ーン
⑱ 発 明 者 ジュン ボラック
⑲ 出 願 人 ザ バブリック ヘル
ス リサーチ インス
チテュート オブ ザ
シティ オブ ニュ
ーヨーク
⑳ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外2名

アメリカ合衆国ニューヨーク州ニューヨーク、ダブリュ。
フォーティーフォース ストリート 426
アメリカ合衆国ニューヨーク州ブルツクリン、モンタギユ
ー ストリート 57
アメリカ合衆国ニューヨーク州、ニューヨーク、ファース
ト アベニュー 455

明 細 書

1. 発明の名称

乳母炎およびその他のブドウ球菌感染症の治療
法

2. 特許請求の範囲

- (1) リソスタフィンおよびリソスタフィンの殺
菌活性を相乗的に高め、ペニシリン、合成ペニ
シリン、その他の抗生物質、キレート剤、弱い界面
活性剤およびその他の膜活性物質より成る群より
選ばれる少なくとも一つの薬剤とをブドウ球菌を
殺す有効量含有する抗ブドウ球菌組成物。
- (2) 許容担体に含有されるリソスタフィンとさ
らに、リソスタフィンの殺菌活性を高めうる、ペ
ニシリン、合成ペニシリン類、細胞壁一括性抗生
物質、キレート剤および弱界面活性剤より成る群
より選ばれる少なくとも一つの薬剤を、リソスタ
フィンの治療効果を相乗的に高める有効量含有す
ることより成る治療薬をブドウ球菌性乳房炎を治
癒する有効量、感染巣に乳房内に注入により投与す
ることより成るブドウ球菌性乳房炎の治療法。

(3) 適当な担体中におよそ0.01μg/錠か
ら10.0μg/錠のリソスタフィンとムタノリ
シンおよびリゾチームを含有して成る溶液に乳頭
を、各搾乳時の前後に浸すことから成るウシ乳房
炎の予防方法。

3. 発明の詳細な説明

発明の背景

本出願はブドウ球菌感染の治療および予防への
リソスタフィンの使用、特に、ブドウ球菌による
ウシ乳房炎の治療および予防に関する。

リソスタフィンは、元来Schindler および
Schuhartにより分離され、スタフィロコッカス・
スタフィロリティカス(Staphylococcus
staphylolyticus)と命名された一既知株スタフ
イロコッカス・シミュランシ(Staphylococcus
simulans)により分泌されるバクテリオシンであ
る。リソスタフィンのS. staphylolyticusによる
製造は1966年10月11日に発行の米国特許
No. 3,278,378およびProceedings of
the National Academy of Sciences, 51巻、4

14-421頁(1964年)に記載されている。リゾスタフィンを生産した一菌株 *S. staphylo-lyticus* (NRRL B-2628) は最近 Sloan ら、J. System. Bacteriol. 32巻、170-174頁(1982年)により *S. simulans* の生物変異株と同定された。*S. staphylo-lyticus* は Approved List of Bacterial Names (細菌名の承認リスト) にないので、リゾスタフィン生産菌も *S. simulans* と再命名された。

バクテリアシンはバクテリアが分泌し、近縁バクテリアを殺したり溶菌したりするたん白質である。例えば、リゾスタフィンは実質的に全ての既知ブドウ球菌種を溶菌し殺すが、他の属のバクテリアに対しては活性がない。*S. simulans* (NRRL B-2628) を報告文献に従って増殖させた培養液から分離されるリゾスタフィンはブドウ球菌の細胞壁に存在するペプチドクリカンのポリグリシン架橋結合を切断するエンドペプチダーゼである。さらに、リゾスタフィンを生産する培養菌はその活性に耐性であるが、リゾス

タフィン非生産条件下で増殖させた培養菌は感受性である。

リゾスタフィンは *S. simulans* を液体培養で増殖させる発酵法により生産できることがわかつている。そのような発酵法は1966年10月11日発行の米国特許No. 3, 278, 378および Proceedings of the National Academy of Sciences、51巻、414-421頁(1964年)に記載されている。発酵法によるリゾスタフィンの生産の種々の改良は1968年8月20日発行の米国特許No. 3, 398, 056および1971年7月20日発行のNo. 3, 594, 284に記載されている。後者の2つの文献では発酵によるリゾスタフィンの生産を促進し、改良するための培養地および接種方法の改良が開示されている。リゾスタフィンは *S. simulans* の対数増殖期に不活性な前駆体として生産される。プロ酵素は *S. simulans* の休止期の培養菌が生産するプロテアーゼにより活性な成熟たん白質に変換される。

さらにリゾスタフィンはリゾスタフィン遺伝子

を発現する *E. coli*, *Bacillus subtilis* および *Bacillus sphaericus* などの組換え微生物によっても生産される。通常の生産とは違って、組換えのリゾスタフィン生産菌株での培養地ではリゾスタフィンは対数増殖期に完全にプロセスされた成熟活性酵素として、ブドウ球菌の免疫阻性汚染物の存在なく蓄積する。

ウシ乳房炎は酪農家にとって非経済的な問題であり、アメリカ合衆国のみで年間20億ドル以上かかる。この疾患はアメリカ酪農牛の50パーセントにある程度は影響していると考えられ、その結果、使用できない牛乳が出て牛乳の生産量が低下し、感染がひどいとウシの死につながる。

乳房炎は乳腺の感染、主に *Staphylococcus aureus* 或いは *Staphylococcus agalactiae* により、また頻度は低いが *E. coli* およびその他のグラム陰性細菌或いはそれらの合併感染により起る。ブドウ球菌感染のほとんどは従来の抗生物質療法により効果的に治療できることがわかつている。しかしながら、ブドウ球菌による乳房炎は治癒す

るのが難しいことがわかつている。

ウシ乳房炎の従来からの予防法は乳腺を消毒液に毎日覆ける複雑な養生法により(J. S. McDonald, 6 Veterinary Clinics of North American Large Animal Practice 269[1984年]参照)、また時には抗生物質含有の乳腺浸漬による。しかし、日常の抗生物質療法は抗生物質耐性菌株の出願を最少限とするように注意して行なわねばならない。感染が起つたら、抗生物質の乳腺注入を必要とする。このような抗生物質療法は感染を抑え、生産される牛乳は販売できるが、通常、原因微生物を完全に消失させることはしない。

過去にはブドウ球菌による乳房炎は抗生物質治療に対しての応答が悪く、感染の再発と慢性化の傾向があつた。乳房炎の研究の結果、乳房炎の治療に於ける問題の一部はブドウ球菌のかんりの敗が乳腺中で食細胞の多形核好中球(PMN)の内部に生存して残ることによることが明らかとなつた。ブドウ球菌はPMN内では抗生物質の作用から防

脚され、好中球の溶解が起ると食細胞内ブドウ球菌が乳房炎を起すブドウ球菌の再増殖源となると考えられている。

乳房炎治療に於ける食細胞内ブドウ球菌の抗生物質攻撃の機構研究の結果、リソスタフィン[®]は食細胞内ブドウ球菌を殺菌する候補物質からは外されていた。Cravenら、29 *Research in Veterinary Science* 57 (1980年)；Cravenら、21 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 618頁 (1982年)；Cravenら、5 *Comp. Immun. Microbial. Infect. Dis.* 447頁 (1982年)、Cravenら、51 *Journal of Dairy Research* 513 (1984年)。これらの実験ではリソスタフィンを食細胞内のブドウ球菌をクロキサシリン、ゲンタマイシン[®]或いはリソスタフィンで処理する前に細胞外ブドウ球菌を殺菌するための前処理としてインビトロで使用している。Cravenらの実験ははつきりと、リソスタフィン含有の溶液中で20時間インキュベートした後も細胞内ブドウ球菌は生存している

9頁 [1974年]。しかし一般には、リソスタフィンの全身投与については臨床医療分野でも動物医療分野でも強い疑問および躊躇がある。リソスタフィンは局所投与以外に一般的に使用するには免疫原性が強すぎると考えられている。

発明の要約

今回、リソスタフィンが驚くべき効力でブドウ球菌乳房炎を、たとえ慢性型であつても、免疫原性の悪影響なしに予防し、治療するのに使用できることを発見した。予防には、リソスタフィンを日常の乳頭洗滌液の中に入れればよい。リソスタフィンは単独でも使用できるが、乳頭洗滌液はリソスタフィンの他に *Staphylococcus globisporus* により生産されてブドウ球菌に対して有効なバクテリオシンであるムタノリン[®]；およびグラム陽性菌およびグラム陰性菌の細胞壁に含まれるペプチドグリカンの多糖類骨格を加水分解するムラミン酸[®]溶解酵素であるリゾチームのような溶菌剤を含有する。製剤はまた、エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) のようなキレート剤；およびバ

ため、リソスタフィンは乳房炎には効果がないことを示している。51 *Journal of Dairy Research* 515-516頁および第2表。

リソスタフィンはヒト単核細胞を透過することも報告されている。単核細胞はPMNとは異なるタイプの細胞であるから、このヒトのモデルがウシ乳房炎の治療に応用できると思われぬ (van den Broekら、21, *Scand. J. Immunol.* 189頁 [1985年])。

リソスタフィンはまたマウスのブドウ球菌性腎臓炎の治療に、特にメチシリン投与と連続して使用すると有効であることがわかつている。Dixonら、41 *Yale J. Biol. Med.* 62 (1968年)。

ヒトではリソスタフィンは慢性の鼻ブドウ球菌感染の治療薬としても使用されてきた。

(Quickel, Jr.ら、22 *Applied Microbiology* 446頁 [1971年])。耐性ブドウ球菌感染の一例ではリソスタフィンが全身投与された

(Starkら、291 *Medical Intelligence* 23

クテリアの殺菌を高めることの知られている弱性界面活性剤なども含有できる。適当な弱性界面活性剤としては特に、ポリオキシエチレンソルビタンと脂肪酸のエステル類 (Tween 系統)、オクタフルエノキシポリエトキシエタノール (Triton-X 系統)、n-オクチル-β-D-グルコピラノシド、n-オクチル-β-D-チオグルコピラノシド、n-デシル-β-D-グルコピラノシド、n-ドデシル-β-D-グルコピラノシドおよび生物に存在する界面活性剤、例えば、脂肪酸、グリセリド、モノグリセリド、デオキシコレートおよびデオキシコレートのエステル類などがある。

広範囲スペクトルの乳頭洗滌液の予防への使用に加え、洗滌液の種々の成分を菌を除去し、乳房炎を治療するために乳房へ注入でき、例えばリソスタフィンを単独で、或いは弱性界面活性剤と一緒に注入でき、界面活性剤を併用することにより驚くことにリソスタフィンのブドウ球菌殺菌効果は1000倍以上上昇する。さらに、リソスタフィンとペニシリンを併用することにより試験管内

で1000倍のブドウ球菌殺菌作用を示すような相乗作用が認められた。従つて、治療用の注入液はペニシリン、または弱性界面活性剤と任意にキレート剤とをさらに含有できる。

界面活性剤、EDTA、ペニシリンまたは他の増強剤を含有する、或いは含有しないリゾスタフィンを用いて治療用注入することによりブドウ球菌感染を除去することが出来る。好ましくはそのような注入液は他の薬剤を併用しない場合には2から400ppmのリゾスタフィンを含有する。増強剤を含有する併用の場合にはリゾスタフィンの必要量は(相乗的に活性が高められるため)1000倍も低くできる。

リゾスタフィンとペニシリンの相乗的な殺菌活性はペニシリナーゼ陽性の *S. aureus* およびメチシリン耐性 *S. aureus* ("MRSA") に投与した場合にも観察された。MRSAは通常多くの抗生物質に耐性であつて特にヒトで問題が多く、殺菌が困難である。リゾスタフィン/ペニシリンの併用は難しいMRSA感染が従来の抗生物質(例

えばペニシリン)治療により制御できないような特殊な状況での使用に適用されよう。さらにペニシリンおよび他の同じような作用をする物質はリゾスタフィンと併用してブドウ球菌感染および汚染に対する薬剤として有用であろう。

本発明によるリゾスタフィン含有製剤は乳房炎治療への利用として示すが、これら製剤でのリゾスタフィンの増強効果はブドウ球菌による感染および汚染が関与する他の多くの利用にも適当である。従つて、本製剤は外傷保護および治療、消毒液、洗液やローション、或いは外科用挿入などに加えることによつてブドウ球菌感染を制御することに使用できる。さらに本製剤は医療用機器の消毒および環境の消毒が好ましいような時に床、壁およびベッド等の清掃にも使用できる。他の利用法としては、ブドウ球菌の鼻腔感染を低下するための鼻腔注入、および肉、卵、チーズおよび魚類の処理、或いは包装および取り扱い器具などの食品関連の利用などがある。

本発明の第一の側面は、リゾスタフィンおよび

リゾスタフィンの殺菌活性を相乗的に高めうる、ペニシリン、合成ペニシリン、その他の抗生物質、キレート剤、弱い界面活性剤およびその他の脱活性物質より成る群より選ばれる少なくとも一つの薬剤とをブドウ球菌を殺す有効量含有する抗ブドウ球菌組成物に関する。

リゾスタフィンが少なくとも0.01μg/mlの濃度で存在することが好ましい。

また、ペニシリンはリゾスタフィンの殺菌効果を高める有効量で含有することが望ましい。

その量としては、0.1μg/mlから10.0μg/mlの範囲内の量が例示される。

リゾスタフィンの殺菌効果を高めるのに有効量の弱界面活性剤が含有されていてもよい。

その量としては0.1%から1.0%の範囲内である。

更に好ましくは、リゾスタフィンの殺菌効果を高める有効量のペニシリンおよび弱界面活性剤が含有される。

弱界面活性剤は0.1%から1.0%でペニシ

リンとしては0.1μg/mlから10.0μg/mlの量から好ましくは選択される。

さらにムタノリンおよびリゾチームを含有していてもよい。

リゾスタフィンとしてはリゾスタフィンをコードする組換えプラスミドを保有する形質転換微生物に由来するものが好適に使用される。

形質転換微生物としてはプラスミドpBC16-1Lを保有するものが好適に利用される。

本発明の第2の側面は、許容担体に含有されるリゾスタフィンより成る治療薬をブドウ球菌性乳房炎を治療する有効量、感染源に乳腺内注入により投与することより成るブドウ球菌性乳房炎の治療法に関する。

その場合2時から400時間のリゾスタフィンをウシ乳腺に適用すればよい。

リゾスタフィンとしてはリゾスタフィンをコードする組換えプラスミドを保有する *Bacillus sphaericus* 形質転換株により生産されるものが好適に使用される。

かかる生産菌としてはプラスミドpBC16-1Lを保有する形質転換微生物が挙げられる。

治療薬に更にリゾスタフィンの治療効果を高めるのに有効量の弱界面活性剤を含有しているものを使用してもよい。

さらに、リゾスタフィンの殺菌活性を高めうる、ペニシリン、合成ペニシリン類、細胞壁一活性抗生物質、キレート剤および弱界面活性剤より成る群より選ばれる少なくとも一つの薬剤を、リゾスタフィンの治療効果を相乗的に高める量で含有していることが好ましい。

治療薬としてはさらに少なくとも一つの追加の細菌溶解剤を含有しているものでもよい。

かかる追加の細菌溶解剤としてはムタノリシンおよびリゾチームより成る群から選ばれるものが挙げられる。

第3の側面は、適当な担体中におよそ0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾスタフィンを含有して成る溶液に乳頭を、各搾乳時の前後に浸すことから成るウシ乳房炎の予防方法に関する。

sphaericus形質転換株がこの目的に最も適していることがわかつているが、他の菌株もリゾスタフィン源として使用できる。リゾスタフィンをコードする遺伝子を含む組換えプラスミドにより形質転換した微生物からリゾスタフィンを得る一つの方法は1987年8月10日に出願され、米国特許出願852,407の一部継続出願である米国特許出願034,464に詳細に開示されている。両出願共本発明の文献として採用する。

< 治療方法 >

本発明によるウシ乳房炎の予防処理にはリゾスタフィン含有の乳頭洗滌液を使用する。リゾスタフィン含有の乳頭洗滌液を搾乳の前後に毎回使用するとウシ乳房炎の有効な予防が出来る。好ましくは本予防法を群の全てのウシに使用するのがよい。乳頭洗滌液はおよそ1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾスタフィンを許容担体中に含んで成る。さらに、本発明により使用する乳頭洗滌液はおよそ1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のムタノリシン、およそ10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾチームおよび弱性界面活性剤を含有する。許容

その際に溶液がさらにムタノリシンおよびリゾチームを含有するものを用いてもよい。

リゾスタフィンとしてはリゾスタフィンをコードする組換えプラスミドを保有する *Bacillus sphaericus* の形質転換株により生産されたものが好適に使用される。

かかる *Bacillus sphaericus* の形質転換株としてはプラスミドpBC16-1Lを保有しているものが挙げられる。

また、溶液にさらにムタノリシンおよびリゾチームを含有するものも好適に使用される。

本発明により使用するリゾスタフィンは天然または組換え体より得られる。好ましくはリゾスタフィンはリゾスタフィンの合成を指示する組換えプラスミドを保有する *Bacillus sphaericus* 00株から得られ、その結果リゾスタフィンが生育培地中に直接蓄積するので高収量にかつブドウ球菌由来の免疫原性汚染がなく、また面倒なリゾスタフィン精製の必要もなく調整できる。プラスミドpBC16-1Lを保有する *Bacillus*

担体としてはpHおよそ8.0の緩衝液となるもので、水性緩衝液または親水性の軟こうベースなどがある。例えば、非イオン性界面活性剤、脂肪酸または弱性界面活性剤、アルブミンやゼラチンのようなたん白担体、粉末セルロースおよびカルメルなどが担体として使用できる。本発明による乳頭洗滌液はまた、EDTAのようなキレート剤、着色剤およびグリセロール或いはソルビトールのような保湿剤を含有するのが有利である。

ムタノリシンは *Streptomyces globisporus* から得られる。リゾチームはトリ卵白より得られる。予防処置を施しても発生する慢性或いは急性のブドウ球菌によるウシ乳房炎に感染した動物は、リゾスタフィンを乳管内注入することにより有効に治療することができる。乳房当たり2から400 μg のリゾスタフィンの一回投与により多くの場合ブドウ球菌乳房炎の感染を除去して治療できる。感染が持続する場合にはさらにリゾスタフィンの投与を行なう。400 μg より高い投与量は好ましくない副作用、例えば一時的膨満、柔軟および搾乳

菌の低下など、を起すので推奨できない。しかし、このような影響は治療した腺にのみ見られ、従って顕著な生命を左右するような場合にはその腺のみ高い投与量で処理することも良い。命に係わる場合には投与経路も全身分布が可能のように、感染箇所以外の場所も含み、リソスタフィンが腺内で失活しないように防御した適当な被覆剤の静注、皮下注射、或いは筋注および直腸または経口投与などを行なう。

リソスタフィンおよびペニシリンの組合せの注入はこの併用による抗菌活性の見かけ上の相乗作用のため、リソスタフィン単独よりも驚くほど効力が高まることも明かとなった。その上、治療用のリソスタフィン製剤はリソスタフィンの抗菌活性を高めるような他の薬剤、例えば合成ペニシリンやその他の抗生物質、キレート剤、弱い界面活性剤（例えばデオキシコール酸）、および感染部位へのリソスタフィンの透過を高めるような膜に活性のある他の薬剤を含有できると考えられている。例えばペニシリンを含有する製剤では、リソ

スタフィンの抗菌活性が高められるのでリソスタフィン投与量を低くできる。リソスタフィンの投与量が多いと好ましくない副作用を誘発する可能性があるため、このような相乗効果は効力の点からだけでなく、副作用を回避できる点でも有益である。

実施例1-4

リソスタフィン、ムタノリシンおよびリソチーム組成物の *S. aureus* およびその他の乳房炎病原菌に対する殺菌活性を調べるために試験管内実験を行なった。手順は以下のとおりである：

<生菌数測定>

1. 一晚インキュベート（37℃）した平板からのバクテリア細胞（通常 10^9 個/皿）をトリス緩衝液（20 mM トリス、pH 8）にけん濁する。
2. 10 μ l のバクテリア細胞けん濁液と1 ml の対照および洗滌試験処方（即ち、リソスタフィン組成物を含有する牛乳、緩衝液、或いは緩衝界面活性剤等）を合わせる。
3. 細胞を37℃にて種々の時間インキュベ

ートする。

4. 細胞液を卓上遠心分離を用いて2分間遠心分離して集菌する。

5. 沈でん物を1.0 ml のファージ緩衝液で2回洗滌する。

6. 細胞を1.0 ml のファージ緩衝液に再けん濁し、ファージ緩衝液を用いて適当に希釈した後、100 μ l をGL寒天（*S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*）またはトリプトケース大豆寒天（*S. agalactiae*）にまく。

7. 平板を37℃で一晚インキュベートし対照平板および試験平板上のコロニー形成単位（以後CFUという）を計測して生存パーセントを決定する。

<ファージ緩衝液の組成>

50 mM トリス、pH 7.8；1 mM $MgSO_4$ ；4 mM $CaCl_2$ ；100 mM $NaCl$ ；ゼラチン、1.0 g/l（ファージ緩衝液は処理により溶菌しなかつたプロトプラストやスファエロプラストを安定化するのに役立つ）。

<GL寒天の1リットル当たりの組成>

Difco 製カザミノ酸、3.0 g；Difco 製酵母エキス、3.0 g； $NaCl$ 、5.9 g；乳糖ナトリウム（60%、w/v）、3.3 g；25%（v/v）グリセロール、4.0 g；寒天、15 g；pHを7.8に調整。

<トリプトケース大豆寒天培地の1リットル当たりの組成>

バクトトリプトン、15 g；バクトソイトーン、5 g； $NaCl$ 、5 g；寒天、15 g；pHは7.3に調整。

各種リソスタフィン治療剤の殺菌効果を示す試験管内実験の結果は第I A表から第I C表に示す。結果は *S. aureus* の Newbould 305株、RN451株、ペニシリン耐性株RN1753（ペニシリナーゼ生産株）およびC02株（メチシリン耐性）に対する生存パーセントで表わした。

第IA表

S. aureus の生存数に対するリソスタフィンの影響

菌株	組体	インキュベーション時間	生存パーセント	対照
S. aureus Newbould 305	牛乳	15'	1.01	0.011
		2h	2.8	75.0
	牛乳	15'	0.1	82.0
RN451	牛乳	15'	<0.1	22
		2h	<0.01	41
	緩衝液	2h	nd	2.2

第IB表

S. aureus に対するリソスタフィンの殺菌
活性への非イオン性界面活性剤の影響

菌株	組体	インキュベーション時間	生存パーセント	対照
S. aureus RN451	牛乳	0.1L	0.01L	0.01L
		0.1L	0.1L	0.1L
	緩衝液	2h	7.7	<0.001
RN451	牛乳	0.1L	0.01L	0.01L
		0.1L	0.1L	0.1L
	緩衝液	2h	7.7	<0.001

第IC表

S. aureus に対するリソスタフィンの殺菌
活性へのペニシリンの影響

菌株	組体	インキュベーション時間	生存パーセント	対照
S. aureus RN451	牛乳	0.1L	0.01L	0.01L
		0.1L	0.1L	0.1L
	緩衝液	2h	7.7	<0.001
RN1753	牛乳	0.1L	0.01L	0.01L
		0.1L	0.1L	0.1L
	緩衝液	2h	7.7	<0.001
RN1753 ペニシリンゼ 菌性	牛乳	0.1L	0.01L	0.01L
		0.1L	0.1L	0.1L
	緩衝液	2h	7.7	<0.001
Coli メチシリン耐性	牛乳	0.1L	0.01L	0.01L
		0.1L	0.1L	0.1L
	緩衝液	2h	7.7	<0.001

特開平2-83336 (7)

第IA表はリソスタフィンを1μg/滅、0.1μg/滅、0.01μg/滅および0.00μg/滅(対照)含有する製剤の結果を示す。これらの結果から明かなように、試験した全ての濃度のリソスタフィンで菌液中の菌を殺す効果があることがわかる。牛乳を組体とした場合には1μg/滅および0.1μg/滅のみで生存数の低下が認められた。

第I B表はリソスタフィン製剤に弱非イオン性界面活性剤、オクチルフェノキシポリエトキシ(10)エタノール、(Triton X-100)、の添加効果を示す。例えば、0.1 μ g/mlのリソスタフィンと0.1% Triton X-100で処理すると0.001%以下の細菌しか生存しないが、それぞれの薬剤での単独処理ではそれぞれ2.2%および7.7%が生存した。さらに驚くことに、0.01 μ g/mlのリソスタフィンと0.1% Triton X-100でも0.001%以下の生存が観察された。

第I C表はブドウ球菌の3株に対してのリソスタフィン/ペニシリン併用の相乗効果を示す。各薬剤の濃度によってリソスタフィンにペニシリンを添加した併用は3株全てでリソスタフィンまたはペニシリンの単独よりも100倍から1000倍有効である。

第I D表は *S. aureus* に対するリソスタフィンとペニシリンの順次投与に比較して併用の効果を示す。*S. aureus*を牛乳中に 10^7 個/mlの細菌

数でけん濁し、リソスタフィンとペニシリンと同時に、或いは順次に記載の時間インキュベートした。インキュベーション後、試料を遠心分離して細胞を集め、2回洗滌後1.0 mlのファージ緩衝液に再けん濁し、希釈して100 μ lをGL寒天にまく。コロニー形成単位(CFU)を37℃で一晩インキュベーションしてから計測し、対照に対する生存率をパーセントで測定した。リソスタフィン/ペニシリン併用は *S. aureus* に対してこれらを順次添加したものより少なくとも3桁高い殺菌活性の相乗効果を示す。

第I D表

S. aureus RN451株の生存に対するリソスタフィンおよびペニシリンの順次添加に比較しての併用の効果(37℃、牛乳中)

	併用(2h)	lspn(2h)	pen(2h)	pen(2h) / lspn(0.5h)	lpen(2h) / pen(0.5h)
生存率 (%)	0.0005	23	25	0.3	10
	lspnーリゾスタフィン		penーペニシリン		

さらに、*S. aureus*, *S. agalactiae* および *E. coli* または *Klebsiella pneumoniae* 生菌けん濁液の600nmに於ける濁度を測定するリソスタフィン、ムタノリシンおよびリゾチームの活性測定でキレート剤(例えばEDTA)がこれら3薬剤のそれぞれの活性を高めることがわかった。

これらのデータは、リソスタフィンは速効性で高活性のブドウ球菌殺菌剤であり、その殺菌活性はペニシリンまたは弱い界面活性剤、Triton X-100により1000倍以上高められることを示す。さらにキレート剤を添加するとリソスタフィンの殺菌活性は高まる。また合成ペニシリンや細胞壁に活性のある抗生物質もリソスタフィンの活性を高めると考えられている。リソスタフィンは牛乳中でもブドウ球菌に対する殺菌剤であるが、緩衝液中では牛乳中で見られるおよそ10倍の殺菌活性を示す。

実施例5

実施例1から4までに記載した一般手順に従い、溶菌酵素、非イオン性界面活性剤および緩衝キレ

ート剤を含有するリソスタフィン組成物の殺菌活性を評価するために試験管内実験を行なった。第II表に示すように、1% Triton X-100、0.1 μ g/mlリソスタフィン、10 μ g/mlリゾチームおよび20 mMトリス、pH8.0中の5 mM EDTAを含む製剤(AMBI乳頭洗滌液-0.1)は *S. aureus* Newbould 305株、*S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* McDonald株およびC48株を含む広範囲の乳房炎起因の病原菌および *Streptococcus uberis*, *E. coli*並びに *Klebsiella pneumoniae*の臨床分離株に対して非常に有効であつた。

第Ⅱ表

乳房炎病原菌に対するAMB I 乳頭洗液-0.1の試験管内効力

菌株	生菌数	生存率 (%)
Staphylococcus aureus (Newbould 305)	7.0×10^5	<0.001
Staphylococcus aureus (RM451)	5.7×10^5	<0.001
Staphylococcus epidermidis (PS)	8.3×10^5	<0.001
Streptococcus agalactiae (McDonald)	3.9×10^5	<0.001
Streptococcus agalactiae (C48)	2.9×10^4	<0.001
Streptococcus uberis (PS)	6.9×10^5	<0.001
Escherichia coli (PS)	9.1×10^5	<1.0
Klebsiella pneumoniae (PS)	9.6×10^5	<1.0

実施例 6

リゾスタフィン乳頭洗液組成物の生体内での効力を示すためウシでの試験を行なった。試験は一般には National Mastitis Council (国立乳房炎評議会) のプロトコール A に従って行なった。一般的には、乳頭を 1% ヨード洗液で清浄してペーパータオルで乾かす。次に乳頭をアルコールで洗って自然乾燥する。次に一頭当たり 4 個全ての乳頭を *S. aureus* Newbould 305 株の 10^8 個/個のけん濁液に乳頭の 1/2 が浸かるように浸漬し、30 分間自然乾燥する。2 個の乳頭 (前の右と後ろの左) をリゾスタフィンの試験用乳頭洗液製剤 (0.85% 食塩水中に $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾスタフィン) の中に 2/3 が浸かるように浸漬し、30 分間自然乾燥する。残りの 2 個の乳頭は非処理対照とする。それぞれの乳頭を先ず湿った綿でふき、10 ml の 0.85% 滅菌食塩水で洗う。洗液は 30 ml の滅菌管に集める。洗液の 0.2 ml およびその適当な希釈液を血液寒天平板上に二連でまき、37℃で 24-48 時間インキ

ュベートした。コロニー形成単位を計測し、*S. aureus* の対照に対する生存率を計算する。

0.85% 塩溶液中の $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のリゾスタフィン溶液はウシ乳頭表面に感染した *S. aureus* を完全に消滅した。さらに乳頭を *S. aureus* の細胞液で処理する前にリゾスタフィンを乳頭表面に投与しても乳頭表面に十分な活性が残存して乳頭での増殖を防いだ。残存活性はリゾスタフィンが除去されるのを軽減するために重合体吸着剤および/または不活性担体たん白を添加することで高めることができる。

実施例 7

実施例 6 の結果および試験管内実験で得られた結果に従って、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ リゾスタフィン、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ リゾチーム、1.0% Triton X-100 および 5 mM EDTA を 20 mM トリス緩衝液、pH 8.0、に溶解した強力乳頭洗液製剤 (AMB I 乳頭洗液 1.0) について

S. aureus Newbould 305 株に対する消毒効力を調べた。乳頭を *S. aureus* Newbould 305 株

細胞 10^8 個/個に浸け、30 分間自然乾燥した。次に乳頭を AMB I 試験用乳頭洗液-1.0 ($1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ リゾスタフィン、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ リゾチーム、1.0% Triton X-100、5 mM EDTA、20 mM トリス緩衝液、pH 8.0) に浸けて 30 分間自然乾燥した。乳頭を湿った綿でふき、10 ml の滅菌 0.85% 塩溶液ですすいだ。綿と洗液とを別々に血液寒天平板にまき、24-48 時間インキュベートした後 CFU を測定した。第Ⅲ A 表に示す結果は明らかに本調製物の有効性を示す。処理乳頭では少なくとも 3 桁低い数の *S. aureus* 細胞が見られ、50% の乳頭で *S. aureus* の感染が全く見られなかった。

同様の実験を *Streptococcus agalactiae* McDonald 株の 2×10^7 個/個の細胞液に乳頭を浸け、30 分間自然乾燥して行なった。この実験結果を第Ⅲ B 表に示す。処理した乳頭は全て *S. agalactiae* が検出されなかった。

特開平2-83336 (10)

第ⅢA表

ウシ乳頭の *Staphylococcus aureus* に対する
AMB I 乳頭洗液液-1, 0 のインビボ効果

ウシ番号	対照		処理	
	1ml 当たりの CFU	1ml 当たりの CFU	1ml 当たりの CFU	1ml 当たりの CFU
	LF	RF	LH	RF
1	225	1,675	13	0
2	24,500	19,500	8	175
3	300	15,000	0	15
4	78	155	0	150
5	50,500	18,750	5	8
6	44,250	65,500	0	0
7	75	43	35	3
8	175	1,150	0	0
9	68	58	0	5
10	558	300	0	0
平均	12,072	12,213	6	36
陰性の数	0/10	0/10	6/10	4/10

第ⅢB表

ウシ乳頭の *Streptococcus agalactiae*
(McDonald 株) に対する乳頭洗液液-1, 0 のイ
ンビボでの有効性

ウシ番号	対照		処理	
	1ml 当たりの CFU	1ml 当たりの CFU	1ml 当たりの CFU	1ml 当たりの CFU
	LF	RF	LH	RF
1.	5	15	0	0
2.	53	360	0	0
3.	115	48	0	0
4.	150	10	0	0
5.	13,750	1,200	0	0
6.	16,250	725	0	0
7.	95	320	0	0
8.	0	450	0	0
9.	1,175	775	0	0
10.	150	300	0	0
平均	2,574	420	0	0
陰性の数	1/10	0/10	10/10	10/10

実施例 6

モルモットの乳頭に 200-300 CFU の
S. aureus Newbould 305 株を感染させた。感
染 3 日後に 200 μ l の 0.85% 滅菌塩溶液に
溶解したリソスタフィンを一回注入した。処理後
6 時間目およびそれ以後 12 時間毎に少なくとも
5 日間、乳を採取した。処理および非処理の乳頭
からの乳試料 100 μ l を血液寒天平板上にまいた。
24-48 時間インキュベート後、CFU を
決定するために計測した。感染を防止できる十分
量のリソスタフィンを単回投与しても副作用は見
られず、リソスタフィンの乳頭内への注入はブド
ウ球菌性乳房炎に対して有効であることを示した。
125 μ g/kg の処方で 6 時間までに乳頭は感染
から回復し、実験中感染は見られなかった。

第Ⅳ表

モルモットを用いた実験ブドウ球菌乳房炎に対する
リソスタフィンの乳頭内注入の効果

		リソスタフィン投与量 μ g/kg				
		1.0	5.0	25.0	62.5	125.0
非感染動物数	(0/10)	(1/0)	(1/2)	(2/2)	(1/1)	(7/7)

以上の実施例からリソスタフィンがブドウ球菌
乳房炎の治療に有効であり、その効果はペニシ
リンまたは弱性界面活性剤やキレート剤などの物質
と併用して使用することにより大きく高められる
ことがわかる。

リソスタフィンの *Bacillus* を用いた生産

本発明により使用するリソスタフィンは天然源
または組換え体から得ることが出来る。好ましく
は、リソスタフィンはリソスタフィン合成を指示
する組換えプラスミドにより形質転換した

Bacillus sphaericus 00 株に由来する培養物

より得られ、これに関しては1986年4月16日に出願された米国特許No. 852, 407号の一部継続出願であり、1987年4月10日に出願された同時係続出願であるNo. 034, 464号に記載されている。本法によると高レベルでブドウ球菌由来の免疫原性汚染のないリソスタフィンの生産が出来る。活性型リソスタフィンが生育培地中に直接蓄積するのでリソスタフィンの精製も容易である。この方法を用いる際、プラスミドpBC16-1Lを保有する *Bacillus sphaericus* 00形質転換株 (*B. sphaericus* 00/pBC16/1L) が目的に特に適していることがわかっているが、他の *Bacillus* の形質転換株も有用なリソスタフィン源となる。

リソスタフィン生産微生物をリソスタフィン生産に適した条件下で生育させる。至適条件は菌株により変わるが、ある種の生育培地および発酵条件がリソスタフィン生産を高めることが知られている。*Bacillus sphaericus* 00/pBC16/1L形質転換株では、好ましい生育培地はVY

液体培地(25g子牛肉浸出液+5g酵母エキス/リットル)で十分に通気した条件がよい(第V表参照)。

第V表

Bacillus sphaericus 00/pBC16-1L形質転換株による
リソスタフィン生産に対する通気の影響

Klett	100 rpm	200 rpm	回転速度	
			200 rpm (みぞつき)	320 rpm
250	21.8	36.2	35.9	30.0
350	40.1	68.9	45.3	45.0
400	88.5	62.7	102.8	71.4
450	n/a	86.4	52.3	135.9
0/N	64.4	31.3	37.6	57.5

300 mlのクレットフラスコに容れた培地(40 ml)に4 mlの一晩前培養物を接種した。
生育培地: 5 μg/mlのエリスロマイシン含有VYブロス。

増殖過程で試料を採取した。上澄液についてリソスタフィンの活性を *S. aureus*の死菌けん濁液の消濁の高度により測定した。結果は1 ml当たりのリソスタフィンのμgで表わしてある。

B. sphaericus 00/pBC16-1L形質転換株はVY培地で増殖させると培養液1リットル当たりおよそ130 mgのリソスタフィンを生産し、分泌した。これは現在可能な最適の発酵条件下で *S. simulans*が生産する量の4倍以上の量である。リソスタフィンは培養液中で長くインキュベーションを続けてもほとんど分解せずに培地中に蓄積され、固体外の全たん白の80%以上を占める。

リソスタフィンは培養液より公知の分画沈でん(塩析)法により単離される。別法として、特に効果的な精製はリソスタフィン生産性 *B.*

sphaericus 00/pBC16-1L形質転換株の培養物の発酵液を沈でん法とクロマトグラフィーによる分離とを組合せてできる。

固形は発酵液より、例えば遠心分離または限外濾過によつて、除去し、固型硫酸アンモニウムも40-60%飽和、好ましくは50%飽和で上澄液に添加する。4℃にて1時間後にリソスタフィンを含有する沈でんを遠心分離により回収する。

この段階での回収は80%以上である。

沈では最少量のりん酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.00, 50 mM NaCl) に再溶解し、100 培養の同じ緩衝液に対して透析する。特別の物質を除去した後、透析液を陽イオン交換カラム (好ましくは Pharmacia FPLC モノ S) でクロマトグラフィーにかけ、塩濃度 0.05 から 0.25 M NaCl の緩衝勾配を用いて溶出する。一回のクロマトグラフィーでのリソスタフィンの回収は90%以上であった。リソスタフィン活性は二つの主要ピーク (第1図) に存在した。後ろに溶出するリソスタフィンのピークはたん白の非共有凝集物より成る。この凝集物は緩衝液での希釈およびドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動下で遊離する。

リソスタフィンをコードする遺伝子を含むプラスミドベクター pBC16-1 の構築

Bacillus sphaericus のリソスタフィン生産株は組換え DNA 技術を用いて、好ましくは同時保菌出願 852, 407 号および 034, 464 に

り検出し、ニトロセルロースフィルターに移した。フィルターを NET 緩衝液 (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.02 M トリス, pH 8.0) で洗い、移した DNA を 1 M NaCl 含有の NET 緩衝液中で 65°C、1 時間インキュベーションして溶出した。n-ブタノールによる抽出で臭化エチジウムを DNA から除去する。水溶液に 2 培養の冷 95% エタノールを添加して DNA を沈し、遠心分離によつて集めた後 80% エタノールで洗つて TE 緩衝液 (10 mM トリス, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解する。*B. subtilis* および *B. sphaericus* を形質転換してリソスタフィン発現の出来る組換えプラスミドはプラスミド pBC16 の誘導体 (pBC16-1) をクローニングベクターとして使用して構築した。pBC16 は元来、*B. cereus* から単離され (K. Bernhard, H. Schremp および W. Goebel, J. Bact., 133 巻、897 頁、1978 年) たテトラサイクリン耐性 (Tet^r) の *Bacillus* のプラスミドである。銅阻酵素分析およ

記載される方法により調整できる。具体的には、*S. simulans* の全 DNA を適当な制限エンドヌクレアーゼで部分消化し、得られる DNA 断片を適合する末端を有し、抗生物質耐性マーカーおよび lac Z' 遺伝子 (即ち、β-ガラクトシダーゼ遺伝子) を保有する線状化した既知ベクター (pUC8) と結合する。ライゲーション反応液を形質転換により *E. coli* (JM105) に移す。リソスタフィン遺伝子がプラスミド中にうまく挿入したものは先ず適当な抗生物質に生育する形質転換株を選択し、続いて lac Z' 陰性の表現型を見つけることにより検出できる。リソスタフィンの生産は *S. aureus* のけん濁の濁度指標を液体または寒天平板での菌落で検出する。

種々のリソスタチン生産 *E. coli* JM105 形質転換株を用いてそのプラスミド DNA の制限酵素解析およびサブクローニングをした結果、リソスタフィンをコードする DNA 配列は 1.5 kbp の Hpa II-Hind III DNA 断片に特定された。断片は電気泳動後臭化エチジウム染色によ

びサザンハイブリダイゼーションで pBC16 と区別のつかないプラスミドが *B. subtilis* および *B. sphaericus* の土壌分離株からも見つかつている (J.

Polak および R. M. Novick, Plasmid 7 巻、152 頁、1982 年)。

クローニングベクターとして使用した pBC16 の誘導体 (pBC16-1) は *S. aureus* 由来のエリスロマイシン耐性 (erm^r) プラスミドであるプラスミド pE194 (*B. Weissblum*, H. Y. Graham, T. Gryczan および D. Dubnau, J. Bact., 137 巻、635 頁、1979 年) の T_{aq}I 断片とプラスミド pBC16 の T_{aq}I 部分消化物とを T4 リガーゼでライゲーションして構築した。ライゲーション液をプロトプラスト形質転換 (*S. Chang* および S. N. Cohen, molec. Gen. Genet., 168 巻、111 頁、1979 年) によつて *B. subtilis* に移し、テトラサイクリンとエリスロマイシンの両剤に耐性のクローンを選択した。その一つを pBC16-1

と命名した。

制限酵素分析の結果、pBC16-1はpBC16のTaqI断片の全てとpE194のエリスロマイシン耐性を含有するTaqIA断片とを含有していることがわかった。次にpBC16-1を制限エンドヌクレアーゼPvuIIで消化してテトラサイクリン耐性因子の大部分を含むプラスミドDNAの25%を除去した。PvuII消化したバクターpBC16-1は仔ウアルカリフオスファターゼで処理した。リゾスタフィンをコードする1.5 kbpのDNA断片をDNAポリメラーゼのクレナウ断片で処理した。1.5 kbpのDNA断片とプラスミドDNAを混合してT4リガーゼを用いてライゲーションし、ライゲーション液をプロトプラスト形質転換により *B. subtilis*に移した。形質転換株はエリスロマイシン耐性、テトラサイクリン感受性で *S. aureus*の死菌を含む寒天で培養した時透明ゾーンで示されるように、リゾスタフィンを生産した。一つのそのようなリゾスタフィン生産クローンを選択して *B. subtilis*

/pBC16-1Lと命名した。

B. subtilis/pBC16-1L形質転換株から抽出したプラスミドpBC16-1L DNAを臭化エチジウム-塩化セシウム密度勾配超遠心分離の後単離した。プラスミドpBC16-1L DNAをプロトプラスト形質転換により、*B. sphaericus* 00株を含む各種 *Bacillus* 種に移した。形質転換株はエリスロマイシン耐性でリゾスタフィンを生産した。*B. sphaericus* 001 pBC16-1L形質転換株が最大量のリゾスタフィン生産を示し、天然の酵素的に活性のある生成物を蓄積した。*B. sphaericus* 00株は元は土壌より分離され、ニューヨーク州、ニューヨークの Public Health Research Institute (公衆衛生研究所)の保存菌株で(RN3106)維持されている。*B. sphaericus* 00/pBC16-1Lもニューヨーク州、ニューヨークの Public Health Research Instituteの保存菌株中で維持され、American Type Culture Collectionに受渡番号ATCC No. 67398として寄託

されている。

4. 図面の簡単な説明

第1図はリゾスタフィンをコードする組換えプラスミドpBC16-1Lを保有する *B. sphaericus* 00株の形質転換株が生産するリゾスタフィンのクロマトグラムを示す。

代理人 浅 村 昭

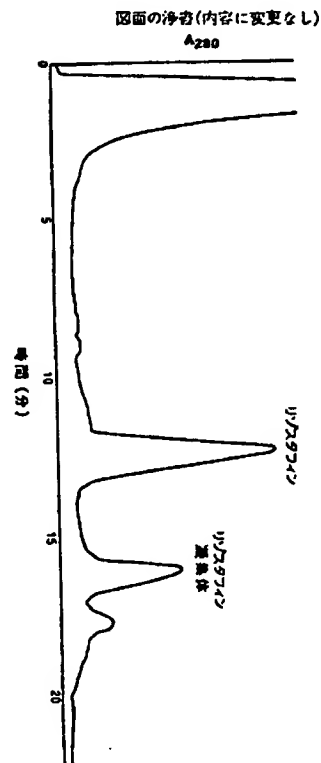


Fig 1: リゾスタフィンの高速液体クロマトグラム

手続補正書 (方式)

特許庁長官殿

昭和 1 年 1 月 10 日

1. 事件の経緯

昭和 63 年 特許第 234683 号

2. 発明の名称

乳母乳およびその他のブドウ球菌感染症の治療法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人
氏名 (名称)

ザ パブリック ヘルス リサーチ インスティテュート オブ
ザ シティ オブ ニューヨーク

4. 代理人

居 所 〒100 東京都千代田区大塚二丁目2番1号
新大塚町ビルディング 331
電 話 (211) 3651 (代 表)
氏 名 (4449) 弁護士 佐々 村 昭

5. 補正命令の日付 昭和 63 年 12 月 20 日

6. 補正により増加する請求項の数

7. 補正の対象

願書の特許出願人 (法人) 代表者氏名の欄

代理権を証明する書面

図面

法人格証明書及びその訳文各 1 通



8. 補正の内容 別紙のとおり

願書に最初に添付した図面の浄書 (内容に変更なし)

方 大